

Comparing the Effect of Hydro-alcoholic Extract of *Viola odorata* and Melatonin on Tumor Growth and NF- κ B, TNFR1, and VCAM-1 Expression Rates in 4T1 Breast Cancer Model: An In vivo Study

Hiva Alipanah¹,
Mohammad Reza Bigdeli^{2,3},
Mohammad Ali Esmaeili⁴,
Mohammad Esmail Akbari⁵

¹ PhD in Animal Physiology, Faculty of Sciences, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

² Associate Professor, Cancer Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

³ Associate Professor, Department of Biology, Faculty of Sciences, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

⁴ Assistant Professor, Department of Biology, Medicinal Plants and Drugs Research Institute, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

⁵ Professor, Cancer Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

(Received August 14, 2016; Accepted November 26, 2016)

Abstract

Background and purpose: *Viola odorata* is a medical plant used in the treatment of hepatic disorders and relieving cancer pain. Melatonin (Mel) can act as an antioxidant and prevent cells against oxidative stress. This compound has a direct inhibitory effect on cancer cell proliferation. In the present study, we performed an in-vivo study to evaluate the effects of *Viola odorata* hydro-alcoholic extract (VOE) and MEL on tumor growth and NF- κ B, TNFR1, and VCAM-1 expression rate in 4T1 breast cancer model.

Materials and methods: In this experimental study, 4T1 cells, which were cultured in-vitro, were harvested and put in a serum-free suspension medium. The animals (five groups, n=5) received subcutaneous injections of 0.1 ml of cell suspension (0.8 million cells) in the right mammary gland or hind flank. The implanted BALB/c mice with 4T1 cells were treated with different concentrations of VOE (50, 150, and 250 mg/kg) and Mel (40 mg/kg) for 21 days. The control group received distilled water. The mice were sacrificed on day 22. NF- κ B, TNFR1, and VCAM-1 expression rate was measured by Western Blotting technique. To analyze the data, ANOVA test was run in SPSS, version 16.

Results: The size of tumors in Mel (P=0.000) and VOE250 (P=0.0001) treated mice was smaller compared to that of the control group. Our results indicated that Mel (P=0.022) and VOE250 (P=0.02) increased TNFR1 expression. On the other hand, Mel (P=0.034) and VOE150 (P=0.04) decreased VCAM-1 expression in the 4T1 breast cancer model. Unlike the Mel group, NF- κ B expression reduced in the group receiving VOE250 compared to that of the control group (P=0.012).

Conclusion: It seems that VOE and Mel can reduce the rate of tumor growth in 4T1 breast cancer model by decreasing the expression of VCAM-1 and NF- κ B and enhancing the expression of TNFR1.

Keywords: melatonin, NF- κ B, TNFR1, VCAM-1, *Viola*

مقایسه اثر عصاره هیدروالکلی گل بنفشه و هورمون ملاتونین بر رشد تومور و میزان بیان فاکتورهای NF- κ B، TNFR1 و VCAM-1 در مدل سرطانی سینه 4T1 در شرایط *in vivo*

هیوا علی پناه^۱
محمد رضا بیگدلی^{۳،۲}
محمد علی اسماعیلی^۴
محمد اسماعیل اکبری^۵

چکیده

سابقه و هدف: *Viola odorata* به عنوان یک داروی گیاهی در درمان اختلالات کبدی و کاهش درد ناشی از سرطان استفاده می شود. ملاتونین (Melatonin: MEL) می تواند به عنوان یک آنتی اکسیدان عمل کند و سلولها را از استرس های اکسیداتیو حفظ نماید. ملاتونین یک اثر مهارى مستقیم بر تکثیر سلول های سرطانی دارد. در این مطالعه، تأثیرات عصاره هیدروالکلی *Viola odorata* و MEL بر میزان رشد تومور و بیان فاکتورهای NF- κ B، TNFR1 و VCAM-1 در مدل سرطان سینه 4T1 مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی، سلول های 4T1 کشت شده پس از برداشت، در سوسپانسیون عاری از محیط کشت قرار گرفتند. به ۵ گروه ۵ تایی از موش ها، به میزان (۰/۸ میلیون سلول) ۰/۸ mL به صورت زیر پوستی در ناحیه غدد پستانی سمت راست یا قسمت عقبی بدن تزریق شد. موش های BALB/c پیوند داده شده با سلول های 4T1 با غلظت های گوناگونی از VOE (۵۰، ۱۵۰، ۲۵۰ mg/kg) و MEL (۴۰ mg/kg) به مدت ۲۱ روز تیمار شدند. گروه کنترل آب مقطر دریافت کردند. در روز بیست و دوم موش ها قربانی شدند و میزان بیان فاکتورهای NF- κ B، TNFR1، VCAM-1 با تکنیک وسترن بلائینگ (Western Blotting) اندازه گیری شد. داده ها توسط نرم افزار SPSS 16 و با استفاده از آزمون ANOVA آنالیز شدند.

یافته ها: اندازه تومورها در موش های تیمار شده با MEL ($P=0/000$) و VOE250 ($P=0/001$) از گروه کنترل کمتر بود. همچنین داده های به دست آمده از این پژوهش نشان داد که MEL ($P=0/022$) و VOE250 ($P=0/02$) بیان TNFR1 را کاهش داده اند. از طرف دیگر، MEL ($P=0/034$) و VOE250 سبب کاهش بیان VCMA-1 در مدل های سرطانی 4T1 شده اند. برخلاف گروه MEL، میزان بیان NF- κ B در گروه VOE250 ($P=0/012$) در مقایسه با گروه کنترل کاهش پیدا کرده است.

استنتاج: به نظر می رسد MEL و VOE به ترتیب با کاهش در بیان VCAM-1، NF- κ B و افزایش بیان TNFR1 موجب کاهش میزان رشد تومور در مدل سرطان سینه 4T1 شده اند.

واژه های کلیدی: ملاتونین، NF- κ B، TNFR1، VCAM-1، *Viola*

Email: bigdelimohammadreza@yahoo.com

مؤلف مسئول: محمد رضا بیگدلی - تهران: دانشگاه شهید بهشتی، آزمایشگاه مغز و اعصاب- قلب و عروق

۱. دکترای فیزیولوژی جانوری، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

۲. دانشیار، مرکز تحقیقات سرطان، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۳. دانشیار، گروه علوم جانوری، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

۴. استادیار، گروه بیولوژی، پژوهشکده گیاهان دارویی دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

۵. استاد، مرکز تحقیقات سرطان، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۵/۲۴ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۵/۶/۱۸ تاریخ تصویب: ۱۳۹۵/۹/۶

مقدمه

سرطان سینه یکی از شایع‌ترین سرطان‌های زنان ایرانی و دومین عامل مرگ ناشی از سرطان است (۱). سرطان سینه یک بیماری به شدت ناهمگن است که در اثر تأثیر متقابل عامل‌های خطر وراثتی و محیطی ایجاد می‌شود و به تجمع پیش‌رونده تغییرات ژنتیکی و اپی‌ژنتیکی در سلول‌های پستان منجر می‌شود. چشم‌انداز درمان سرطان در طول چندین دهه اخیر به طور قابل توجهی تغییر کرده است و علاوه بر جراحی و پرتودرمانی، درمان‌های کمکی (هورمون‌درمانی- شیمی‌درمانی) و تخریب تخمدان‌ها از جمله راه‌های درمانی دیگر در سرطان سینه می‌باشد. از آنجاکه، ویژگی‌های مولکولی یک تومور سرطانی، پایه و اساس یک درمان را مشخص می‌کنند، هر روز روش‌های جدیدی نیز برای درمان سرطان معرفی می‌شوند (۲). در این میان، پیدا کردن روش‌های درمانی که اثرگذاری بالایی همراه با حداقل رساندن عوارض جانبی از خود نشان دهند، یکی از مشکلات اساسی محققان سرطان است.

مطالعات زیادی نقش مهاری هورمون ملاتونین (Melatonin: MEL) را در شروع، ادامه و پیشرفت سرطان تأیید کرده‌اند. همچنین، افزایش بروز سرطان سینه، رحم و کولون در بین پرستاران و دیگر کارمندان که شب‌کار هستند، ارتباط بین کاهش سطح ملاتونین و بروز این بیماری‌ها را پیشنهاد می‌دهد. این قبیل شواهد و همچنین فعالیت‌های آپوپتوزی و آنتی‌اکسیدانی ملاتونین و ارتباط آن با سیستم‌های ایمنی و اندوکروینی بدن، اثر ملاتونین بر سلول‌های توموری را تقویت می‌کند. مطالعات اخیر انسانی و حیوانی نشان داده است که ملاتونین در نوپلاسم انسانی، ویژگی‌های مهم انکواستاتیکی را از خود نشان می‌دهد. در این بیماری، ملاتونین سبب تغییر بیان

سایتوکاین‌های ضدسرطانی IL-2 و IL-12 می‌شود (۳). اضافه کردن ۱ nM ملاتونین به محیط کشت سلول‌های سرطانی رده MCF-7، تکثیر سلولی را کاهش و بیان پروتئین‌های پیش‌آپوپتوزی P21 و P53 را افزایش می‌دهد و در نهایت، با افزایش بیان E-cadherin و β 1-integrin موجب کاهش قدرت متاستاز سلولی می‌شود (۴). ملاتونین می‌تواند با مهار محور HPG و به دنبال آن، کاهش هورمون‌های جنسی و نیز با مهار عوامل اکسیدان، تحریک سیستم ایمنی بدن و مهار فعالیت آنزیم تلومراز، موجب مهار رشد سلول‌های سرطان سینه شود (۵). ملاتونین با مهار تأثیرات میتوزن استروژن، با تنظیم کاهش (Down-regulation) پروتئین، mRNA هر دو گیرنده آلفا و بتای استروژن ($ER\alpha, \beta$)، تعدیل پروتئین‌های تنظیم‌کننده استروژن، فاکتورهای رشد و پروتئین‌ها مانند: PR (Progesterone Receptor)، $TGF\beta$ ، cfox، pS2، $TGF\alpha$ و مهار سیستم پروتاژوم، موجب مهار تکثیر سلول‌های سرطانی MCF-7 می‌شود (۶،۷). ملاتونین در سلول‌های سرطانی، سبب کاهش تمایز سلولی می‌شود و با نگه داشتن سلول‌ها در فاز G_1/G_0 چرخه سلولی، طول چرخه سلولی را افزایش می‌دهد (۵). از طرف دیگر، ملاتونین موجب تنظیم افزایشی P53 و P21 و کاهش حالت تهاجمی سلول‌های سرطانی می‌شود (۵).

گل بنفشه معطر (*Viola odorata*) در پزشکی سنتی ایرانی برای درمان سرطان، میگرن، التهاب، تب، اضطراب، فشار خون، اختلالات کلیه‌ها و کبد و عفونت‌های میکروبی و به عنوان آرام‌بخش استفاده می‌شود (۸-۱۰). عصاره گیاه گل بنفشه (*Viola odorata*) برای پیشگیری و درمان کمکی سرطان به ویژه در سرطان‌های دستگاه گوارش و متاستاز پس از جراحی تومورها مصرف می‌شود

بین سلولی مشاهده کرد. mTNF- α میل ترکیبی یکسانی نسبت به هردو گیرنده دارد؛ اما sTNF- α را عمدتاً می‌توان متصل به گیرنده TNFR1 دید. برخلاف TNFR2، گیرنده TNFR1 دارای یک دومین مجری مرگ است که به‌واسطه فعال کردن Caspase 8، آپوپتوز سلولی را تحریک می‌کند (۱۷). یکی از فاکتورهای هدف NF- κ B، ژن VCAM-1 است که به‌عنوان یک پروتئین اتصال سلولی، به مقدار زیادی در سرطان سینه بیان می‌شود و با افزایش متاستاز بافتی ارتباط مستقیم دارد. VCAM-1 با فعال کردن مسیرهای بقای سلولی مانند PIK3، تکثیر سلولی را در سرطان سینه افزایش می‌دهد (۱۸).

مطالعات قبلی نشان داده است که عصاره هیدروالکلی گل بنفشه و ملاتونین در مدل‌های سرطانی 4T1، می‌تواند از رشد تومور سرطانی جلوگیری کنند (۱۶)؛ بنابراین، در مطالعه حاضر مکانیسم‌های احتمالی اثر آن‌ها بر میزان بیان فاکتورهای NF- κ B، TNFR1 و VCAM-1 در مدل‌های سرطانی 4T1 بررسی شد.

مواد و روش‌ها

Viola odorata با شماره هرباریوم MPH-615 از پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی دانشگاه شهید بهشتی تهران تهیه شد. سپس، قسمت‌های هوایی گیاه برای تهیه عصاره هیدروالکلی (۵۰ درصد آب- ۵۰ درصد الکل) استفاده گردید. عصاره‌گیری به‌صورت Maceration و چندباره انجام شد و عصاره به‌دست‌آمده در محل بدون رطوبت و در دمای اتاق، خشک گردید (این روشی کاملاً معمول در عصاره‌گیری است). چون عصاره‌گیری به‌صورت کامل انجام می‌گیرد و مقادیر برحسب میلی‌گرم از پودر خشک استفاده می‌شوند، تعیین درصد خلوص لزرومی ندارد. عصاره‌گیری به مدت سه هفته صورت گرفت و عصاره تهیه‌شده

(۱۱). گل‌ها و برگ‌های بنفشه معطر حاوی فلاونوئیدها، ساپونین‌ها، موسیلاژ، ویتامین C، ساپونین‌ها، آلکالوئید و پلین هستند. مهم‌ترین مواد مؤثر گیاه بنفشه معطر، گروه مواد پیتیدی گیاهی از جمله سیکلوویولاسین (Cycloviolacin) و سیکلوتایداها (Cyclotides) می‌باشند (۱۲). سیکلوویولاسین O₂ (Cyc O₂) یک سیکلوتاید از گیاه *Viola odorata* است که با نفوذپذیر کردن غشای سلول، موجب مرگ سلول‌های سرطانی MCF-7 در محیط کشت می‌شود (۱۳). از طرف دیگر، فلاونوئیدها در برابر بسیاری از سرطان‌ها تأثیرات حفاظتی از خود نشان می‌دهند. فلاونوئیدها با مهار Bcl-2، Bclx (L)، AP-1 (Activator Protein-1)، گیرنده‌های فاکتورهای رشد، MMP (Matrix Metalloproteinase) و VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) موجب کاهش و مهار تهاجم، متاستاز، رگ‌زایی و تکثیر سلولی در سرطان‌های گوناگون می‌شوند (۱۴). همچنین، نشان داده شده است که عصاره آبی *Viola odorata* توانایی مهار رادیکال‌های آزاد را دارد و می‌تواند به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان عمل کند (۱۵). همچنین، مشخص شده است که عصاره هیدروالکلی گل بنفشه نیز می‌تواند به‌طور معناداری، رشد سلول‌های سرطانی سه‌گانه منفی MDA-MB-468 را کاهش دهد (۱۶).

فاکتور رونویسی NF- κ B به‌عنوان یک فاکتور هسته‌ای، موجب تنظیم افزایشی ژن‌های آپوپتوزی، فعال کردن مکانیسم‌های بقای سلولی، تحریک تکثیر سلولی و افزایش آنژیوژنز و متاستاز در سرطان می‌شوند. NF- κ B القای آپوپتوز به‌وسیله فاکتور نکروز بافتی (Factor Necrosis Tumor: TNF) را مهار می‌کند. مشخص شده است که TNF- α به‌واسطه فعال کردن گیرنده‌های TNFR1 یا TNFR2، موجب القای آپوپتوز یا بقای سلولی می‌شود. TNF- α را می‌توان به دو شکل متصل به عشا (mTNF) یا محلول (sTNF) در فضای

به صورت پودر برای مرحله‌های گوناگون آزمایش نگهداری شد.

حیوانات و اصول اخلاقی

تعداد ۲۵ سر موش BALB/c با میانگین وزنی 20 ± 1 g از انستیتو پاستور ایران خریداری و با دسترسی آزاد به آب و غذا و در شرایط ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی و در دمای 22 ± 2 سانتی‌گراد نگهداری شدند. تمام مسائل اخلاقی در زمینه نگهداری، تزریق و گاوژ نمونه‌ها توسط محقق رعایت شده است.

ایجاد مدل سرطانی 4T1

سلول‌های سرطانی 4T1 (انستیتو پاستور ایران، C604) در فلاسک‌های 75 cm^2 در محیط کشت RPMI-1640 حاوی FBS ۱۰ درصد و آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین ۱ درصد، درون انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سلسیوس و CO_2 ۵ درصد نگهداری شدند. پس از پرشدن بستر فلاسک‌ها، سلول‌ها با ترپسین جدا شدند و پس از شست و شو با PBS، تعداد $800,000$ از سلول‌ها (عاری از محیط کشت) به صورت زیرپوستی به ناحیه غدد پستانی سمت راست یا قسمت عقبی بدن موش‌ها تزریق شدند.

گروه‌های آزمایشی

در مطالعه تجربی حاضر، تغییرات حجم تومور با کولیس دیجیتال مورد بررسی قرار گرفت. پس از رسیدن حجم تومورها به 200 mm^3 ، نمونه‌ها به طور تصادفی به ۵ گروه ۵ تایی تقسیم گردیدند. گروه اول (VOE250) با دریافت دوز 250 mg/kg ، گروه دوم (VOE150) با دریافت دوز 150 mg/kg ، گروه سوم (VOE50) با دریافت دوز 50 mg/kg از عصاره، به مدت سه هفته گاوژ شدند. گروه چهارم (Mel) دوز 40 mg/kg از

ملاتونین را به صورت پنج روز در هفته و به مدت سه هفته به وسیله تزریق درون‌صفاقی، یک ساعت قبل از خاموشی دریافت کرد (۱۹). گروه کنترل (Cont) نیز با آب مقطر گاوژ شد. شایان ذکر است که نمونه‌ها در روز بیست و دوم قربانی شدند.

تغییرات حجم تومور

تغییرات حجم تومور به صورت هفتگی به وسیله کولیس دیجیتال و با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد.

$$^2(\text{عرض}) \times (\text{طول}) \times 1/2 = \text{تغییرات حجم تومور}$$

درصد مهار رشد تومور

درصد مهار رشد تومور نیز با فرمول زیر محاسبه شد:

$$100 \times \frac{(\text{وزن تومور گروه تیمار} - \text{وزن تومور گروه کنترل})}{\text{وزن تومور گروه کنترل}} = \text{درصد مهار رشد تومور}$$

وسترن بلائینگ (Western Blotting)

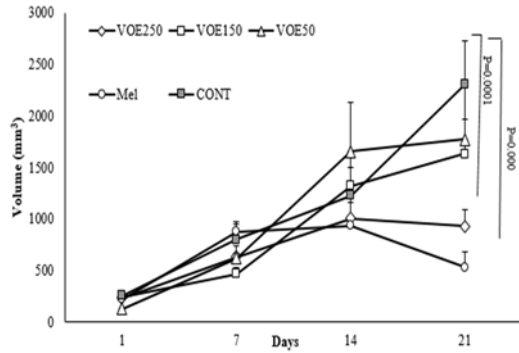
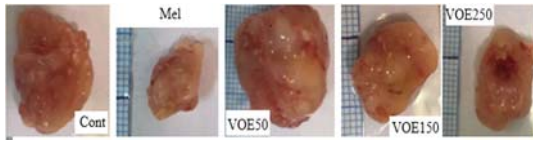
بیان پروتئین‌های NF-kB، TNFR1 و VCAM-1 در گروه‌های آزمایشی (VOE150، VOE250، Mel، VOE50) و گروه کنترل (Cont) و با روش وسترن بلائینگ (با سه تکرار برای هر نمونه) بر روی ژل SDS-page از پلیمرهای آکریل امید اندازه‌گیری گردید. برای لیز کردن بافت‌های توموری سرطان سینه، از RIPA بافر استفاده شد.

ترکیبات بافر لیزکننده

ترکیبات بافر لیزکننده به شرح زیر بود:

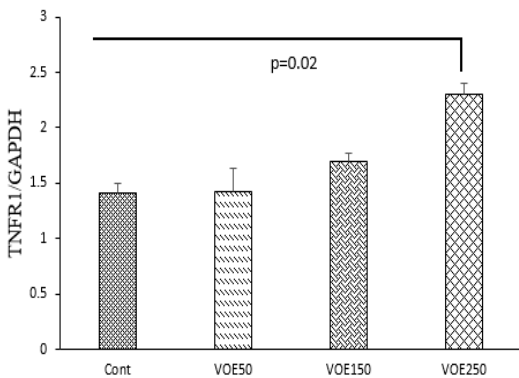
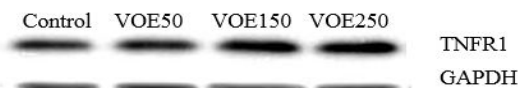
۱ mM NaCl، ۱۵۰ mM، ۱ درصد NP-40، (pH=۸) sodium، ۵۰ mM Tris، ۱ درصد SDS، ۵ درصد EDTA and protease inhibitor، deoxycholate، ۱ mM cocktail.

سوسپانسیون سلولی از بافت‌های لیز شده با استفاده



تصویر شماره ۱: تغییرات حجم تومور VOE50, 150, 250، غلظت‌های گوناگون عصاره (۵۰، ۱۵۰ و ۲۵۰ mg/kg) و MEL در غلظت ۴۰ mg/kg و گروه کنترل را نشان می‌دهد (n=۵).

اثر عصاره هیدروالکلی *Viola odorata* بر بیان *TNFR1* تکنیک وسترن بلائینگ نشان داد که بیان *TNFR1* در گروه VOE250 در مقایسه با گروه کنترل، افزایش معناداری را نشان می‌دهد ($P=0/02$). این در حالی است که تفاوت بین بیان *TNFR1* در گروه‌های VOE50 و VOE150 با گروه کنترل قابل توجه نبود (تصویر شماره ۲).



تصویر شماره ۲: اثر عصاره هیدروالکلی *Viola odorata* بر بیان *TNFR1* (n=۵)

از سانتریفیوژ یخچال‌دار در دمای ۴ درجه سلسیوس و با سرعت ۱۲۰۰۰ rpm و در مدت ۲۰ دقیقه جدا گردید. بافر نمونه به عصاره‌های سلولی اضافه و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سلسیوس جوشانده شد. نمونه‌های پروتئینی در ژل SDS ۱۰ درصد تفکیک شدند. پس از انتقال پروتئین بر روی کاغذ PVDF، نمونه‌هایی با آنتی‌بادی‌های اولیه NF-kB، VCAM-1 و TNFR1 (شرکت Santa cruz، آمریکا) با غلظت ۱ به ۵۰۰ و آنتی‌بادی beta-actin (شرکت Santa cruz) با غلظت ۱ به ۱۰۰۰ به مدت ۱۸ ساعت انکوبه شدند. پس از شست و شو با محلول TBS-T، انکوباسیون نمونه‌ها با آنتی‌بادی ثانویه با غلظت ۱ به ۵۰۰ به مدت ۹۰ دقیقه صورت گرفت. حضور پروتئین‌ها در کاغذهای PVDF با استفاده از کیت ECL و بر روی فیلم‌های عکاسی آشکارسازی شد.

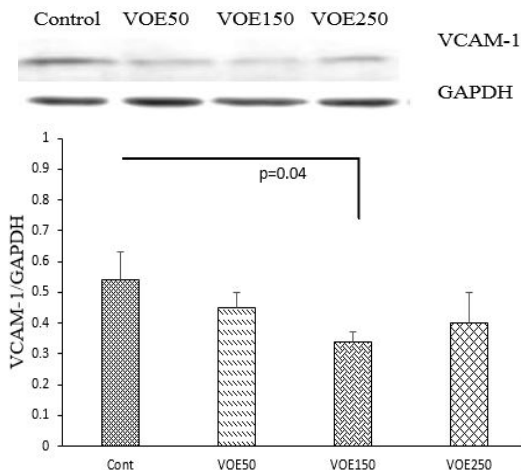
آنالیز آماری

تمام داده‌ها به صورت Mean±S.D ارائه و براساس روش آماری one-way ANOVA و به کمک نرم‌افزار SPSS 16 آنالیز شدند. آن‌ها در تمام موارد $P<0/05$ معنادار گزارش شدند.

یافته‌ها

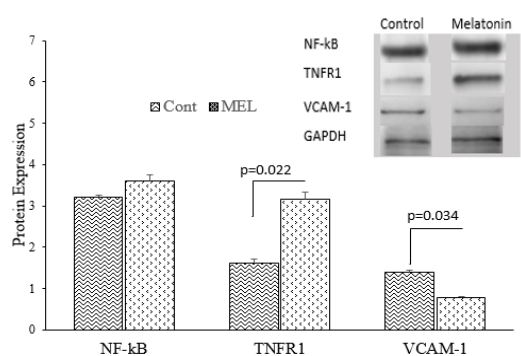
تغییرات حجم و درصد مهار رشد تومور

بررسی حجم تومورها در روز بیست و دوم نشان داد که اندازه تومور در گروه‌های تیمار شده با عصاره کوچک‌تر از گروه کنترل است. ملاتونین و عصاره *Viola odorata* (۲۵۰ mg/kg) رشد سلولی القا شده توسط تومور را به‌طور معناداری مهار نمودند. تفاوت معناداری بین گروه‌های VOE50 و VOE150 با گروه کنترل مشاهده نشد ($P>0/05$). (تصویر شماره ۱).

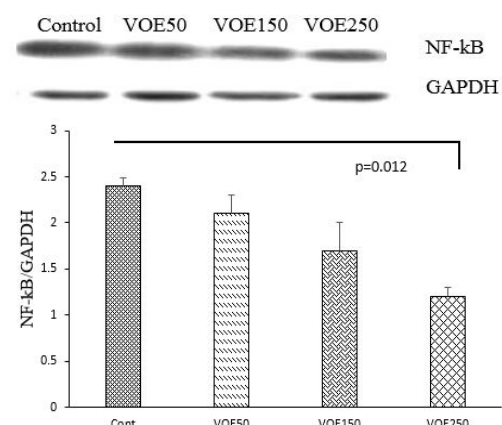


تصویر شماره ۴: اثر عصاره هیدروالکلی *Viola odorata* بر بیان VCAM-1 (n=۵)

اثر ملاتونین بر بیان پروتئین های $NF-\kappa B$ ، $TNFR1$ و $VCAM-1$ مقایسه داده‌های حاصل از تکنیک وسترن بلائینگ نشان می‌دهد که اثر دوز ۴۰ mg/kg ملاتونین بر بیان پروتئین $NF-\kappa B$ در بافت‌های توموری 4T1 تفاوت قابل توجهی با گروه کنترل ندارد ($P>0/05$). این در حالی است که اثر ملاتونین بر بیان فاکتورهای VCAM-1 و $TNFR1$ در مقایسه با گروه کنترل، معنادار بود. دوز ۴۰ mg/kg ملاتونین توانست موجب کاهش معناداری در بیان VCAM-1 در مقایسه با گروه کنترل ($P=0/034$) و همچنین، سبب افزایش معنادار بیان پروتئین $TNFR1$ در مقایسه با گروه کنترل شد (تصویر شماره ۵).



تصویر شماره ۵: اثر ملاتونین بر بیان $NF-\kappa B$ ، $TNFR1$ و $VCAM-1$ (n=۵)



تصویر شماره ۳: اثر عصاره هیدروالکلی *Viola odorata* بر بیان $NF-\kappa B$ (n=۵)

اثر عصاره هیدروالکلی *Viola odorata* بر بیان $NF-\kappa B$ بررسی بیان پروتئین $NF-\kappa B$ در بافت‌های توموری سرطان سینه در مدل‌های 4T1، نشان می‌دهد که تیمار با دوز ۲۵۰ mg/kg عصاره هیدروالکلی *Viola odorata* توانسته به طور قابل توجهی موجب کاهش بیان این پروتئین در مقایسه با گروه کنترل شود ($P=0/012$). این در حالی است که بیان $NF-\kappa B$ در گروه‌های تیمار شده با دوزهای ۵۰ mg/kg و ۱۵۰ mg/kg از عصاره هیدروالکلی *Viola odorata*، تفاوت معناداری را با گروه کنترل نشان نمی‌دهند ($P>0/05$) (تصویر شماره ۳).

اثر عصاره هیدروالکلی *Viola odorata* بر بیان $VCAM-1$ بررسی بیان پروتئین $VCAM-1$ در بافت‌های توموری سرطان سینه در مدل‌های 4T1، نشان می‌دهد که تیمار با دوز ۱۵۰ mg/kg عصاره هیدروالکلی *Viola odorata* توانسته به طور قابل توجهی موجب کاهش بیان $VCAM-1$ در مقایسه با گروه کنترل شود ($P=0/04$). این در حالی است که کاهش بیان $VCAM-1$ در گروه‌های تیمار شده با دوزهای ۵۰ mg/kg و ۲۵۰ mg/kg از عصاره هیدروالکلی *Viola odorata*، تفاوت معناداری را با گروه کنترل نشان نمی‌دهند ($P>0/05$) (تصویر شماره ۴).

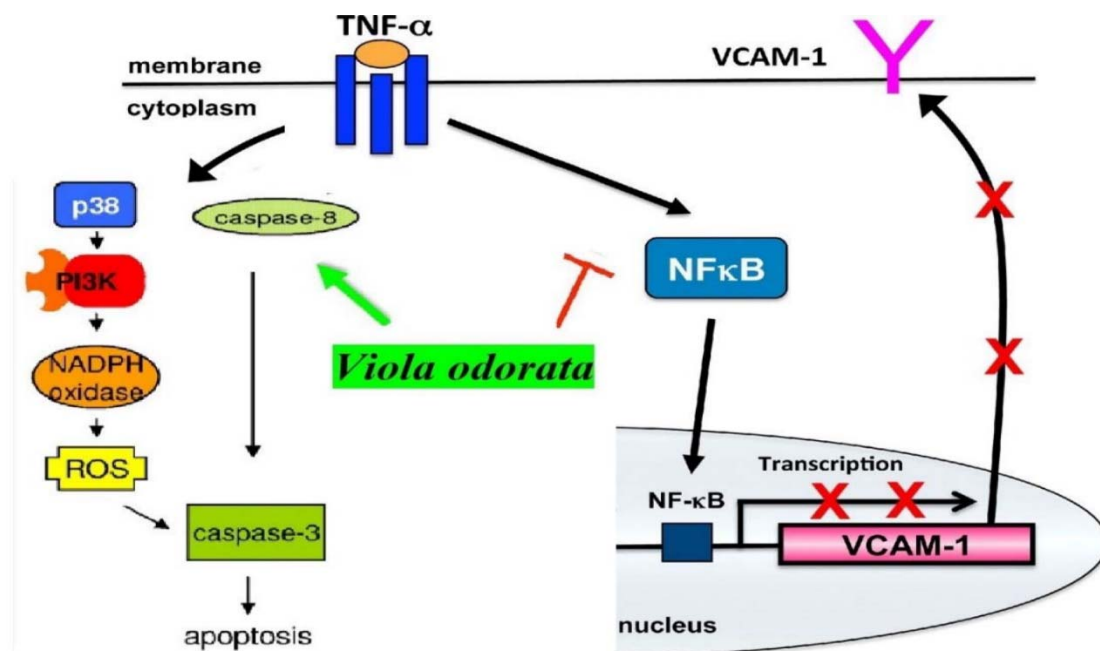
بحث

(Cellular Inhibitor of Apoptosis Protein 1) موجب فعال شدن NF- κ B و افزایش بقای سلولی می‌شود. در کمپلکس II پس از فعال شدن گیرنده TNFR1 به وسیله (Fas-Associated Protein with Death Domain) FADD و Caspase های ۸ و ۱۰، مسیر آپوپتوز فعال می‌شود (۲۳). یک مسیر دیگر پیشنهاد می‌کند که TNFR1 به وسیله فاکتور P38 و به دنبال فعال کردن مسیر سیگنالینگ PIK3 و در نهایت از طریق ROS نیز می‌تواند با فعال کردن Caspase 3، مسیر آپوپتوز را فعال کند. از طرف دیگر، NF- κ B نیز با فعال کردن تنظیم بیان فاکتورهای ضد آپوپتوزی (Bcl-2) و مهارکننده‌های آپوپتوز مانند c-IAP1 و XIAP (X-Linked Inhibitor of Apoptosis Protein) نقشی کلیدی را در مسیر آپوپتوز بازی می‌کند (تصویر شماره ۶) (۲۴، ۲۵).

ملاتونین با افزایش بیان گیرنده مرگ و تنظیم کاهشی پروتئین‌های گوناگون در سلول‌های MCF-7، مرگ سلولی را تحریک می‌کند. VCAM-1 نیز با اتصال به گیرنده‌های اختصاصی و گیرنده‌های سطح سلول‌های سرطانی و فعال کردن مسیرهای سیگنالینگ داخل سلولی مانند PIK3، موجب القای بقا و چرخه سلولی می‌شود (۱۸). افزون بر این، بیان افزایشی VCAM-1، MMP9 و MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1) در بیماران سرطان سینه و حیوانات بدون غده پینه‌آل، یکی از نشانه‌های بارز این بیماری‌ها می‌باشد. به خوبی مشخص شده است که افزایش بیان VCAM-1 می‌تواند عاملی برای افزایش متاستاز در بیماران سرطانی باشد. می‌توان نتیجه گرفت که احتمالاً تأثیرات مفید VEO و ملاتونین به واسطه افزایش TNFR1 و فعال کردن کمپلکس II، کاهش NF- κ B و VCAM-1 بوده است که محرک‌هایی برای افزایش آپوپتوز و کاهش متاستاز

امروزه گیاهان دارویی به منظور پیداکردن ماده مؤثری برای درمان سرطان، یک منبع ارزشمند به شمار می‌آیند. مطالعات زیادی در محیط کشت و در مدل‌های حیوانی، نشان داده است که گیاهان دارویی می‌توانند تأثیرات ضدتوموری خود را به وسیله گوناگونی اعمال کنند. کمک به ترمیم DNA، افزایش ایمنی بدن و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، از جمله این فعالیت‌ها می‌باشد (۲۰). هدف از تحقیق حاضر، بررسی خاصیت ضدتوموری عصاره هیدروالکلی گیاه *Viola odorata* و ملاتونین و همچنین، اثر آن‌ها بر بیان پروتئین‌های NF- κ B، TNFR1 و VCAM-1 بود.

VOE علاوه بر کاهش بیان NF- κ B و VCAM-1، موجب افزایش بیان TNFR1 شد. این در حالی است که ملاتونین با کاهش VCAM-1 و افزایش TNFR1 اثری بر بیان NF- κ B نداشت. مطالعات گذشته نشان داده است که تکثیر سلولی در سلول‌های رده T47D سرطان سینه و در سرطان‌های القا شده توسط مواد شیمیایی، توسط TNF و به واسطه مسیر سیگنالینگ PI3-K/Akt، JNK، MAPK p42/p44 و فعال کردن NF- κ B، تحریک می‌شود (۲۱). Garoma و همکاران نشان دادند که تیمار با داروهای ضد استروژن و متوقف‌کننده گیرنده TNFR1، می‌تواند بقای سلولی را در سلول‌های MCF-7 سرطان سینه افزایش دهد (۲۲). TNFR1، تأثیرات سلولی خود را به وسیله برهمکنش با دو مسیر سیگنالینگ داخل سلولی (کمپلکس I و II) اعمال می‌کند که در نهایت، عاملی برای راه‌اندازی آپوپتوز یا حفظ بقای سلول می‌باشد (۲۳). کمپلکس I با فعال کردن TNFR1 (Necrosis Factor Receptor 1)، TRADD، (TNFR1-Associated Death Domain Protein)، RIP (Receptor-Interacting Protein 1)، TRAF2، (TNF Receptor-Associated Factor 2) c-IAP1،



تصویر شماره ۶: اثر احتمالی *Viola odorata* بر مسیر سیگنالینگ TNFR1

داده است که فراکسیون اتیل استاتی یک گونه از گل بنفشه (*V. tricolor*) با اثر سایتوتوکسیک، از تکثیر سلول‌های سرطانی جلوگیری می‌کند. از طرف دیگر، این فراکسیون اتیل استاتی می‌تواند موجب کاهش قطر رگ‌ها در غشای کوریوآلانتوئیس (Chorioallantois) تخم لقاح‌یافته شود؛ درحالی‌که بر تعداد عروق تأثیری نداشته است (۲۸). مطالعه سمرقندی و همکاران نیز نشان داده است که عصاره گونه‌ای از گل بنفشه (*V. tricolor*)، می‌تواند نسبت Bax/Bcl-2 را در سلول‌های سرطانی Neuro2a افزایش دهد؛ همچنین، از رگ‌زایی در غشای کاردیوآلانتوئیس جنین جوجه جلوگیری کند (۲۹). احتمالاً عصاره *Viola odorata* به واسطه ترکیبات اصلی خود مانند: سیکلوتایدها، فلاونوئیدها و شاید ملاتونین با تأثیر بر آپوپتوز در سلول‌های سرطانی از افزایش حجم تومور جلوگیری می‌کند. فلاونوئیدها می‌توانند پروتئین‌های اصلی در مسیر رشد سلولی، آپوپتوز و آنژیوژنز از جمله: MMP، Bcl-2، P53، HIF- α ، VEGF

در مدل‌های 4T1 بوده‌اند بررسی تغییرات حجم و وزن تومورهای 4T1 در موش‌های BALB/c نشان داد که درصد تغییرات حجم تومور در گروه VOE250 (دوز ۲۵۰ mg/ml) به‌طور معناداری کمتر از گروه کنترل است؛ درحالی‌که گروه‌های VOE150 و VOE50 تفاوتی را با گروه کنترل نشان ندادند. تزریق درون صفاقی ملاتونین نیز از افزایش حجم تومور جلوگیری کرد و درصد تغییرات حجم تومور در این گروه با گروه کنترل، معنادار بود. مهار رشد تومور با VOE250 که با کاهش در تکثیر سلولی و حجم تومور نیز تأیید شده، می‌تواند به دلیل مهار مسیرهای بقای سلولی در رده 4T1 باشد. به‌خوبی مشخص شده است که مهار آنژیوژنز و تقسیم سلولی می‌تواند موجب تقلیل رشد تومور و بقای سلول‌های سرطانی شود (۲۶). از طرفی، افزایش نسبت Bax/Bcl-2 موجب تنظیم افزایشی Caspase 3 و آزاد شدن سیتوکروم C از میتوکندری می‌شود و درنهایت، آپوپتوز سلولی را القا می‌کند (۲۷). نتایج تحقیقات گذشته نشان

رگ‌زایی) می‌شود؛ درحالی‌که آنتی‌اکسیدان‌های شیمیایی، فعالیت میتوژنیک Ras را مهار می‌کنند؛ بنابراین، ROSها می‌توانند به کمک HIF- α تولید فاکتورهای محرک رگ‌زایی را در سلول‌های توموری افزایش دهند (۳۳). افزون بر این، تزریق H₂O₂ یا داروهای ایجادکننده استرس اکسیداتیو (Doxorubicin) به سلول‌های سالم موش‌ها، رگ‌زایی را در محیط *in vivo* تحریک می‌کند (۳۴). با توجه به مطالب اشاره‌شده، می‌توان یک نتیجه احتمالی گرفت که قدرت مهار VOE به‌واسطه فعالیت آنتی‌اکسیدانی، خود برای مهار فاکتورهای همچون Ras و HIF- α می‌تواند در مهار رگ‌زایی و کنترل رشد تومور نقش داشته باشد؛ هرچند بررسی صحت این احتمال نیاز به بررسی‌های بیشتری دارد.

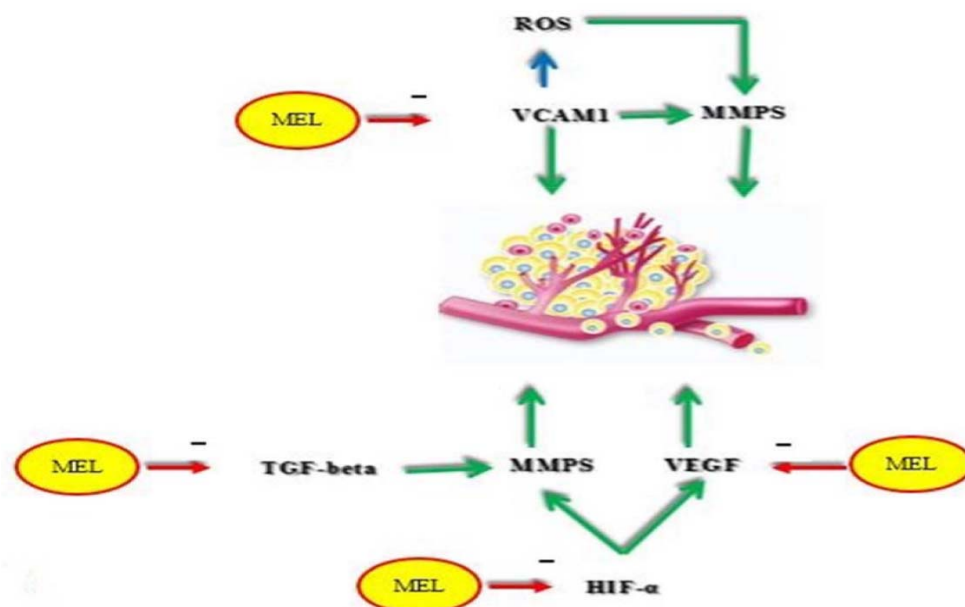
مطالعات قبلی نیز نشان داده است که ملاتونین در مدل‌های زئوگرافت سرطان سینه، می‌تواند تکثیر سلولی رده‌های MDA-MB-431، MCF-7 و همچنین، اندازه تومور را کاهش دهد. افزون بر سرطان سینه، ملاتونین می‌تواند حجم تومور را در سرطان معده کاهش دهد (۳۵، ۱۹). ملاتونین (۱ nM) در شرایط *in vitro* موجب افزایش بیان پروتئین p53 و p21 می‌شود و به‌دنبال آن، سطح رشد سلول‌های MCF-7 را کاهش می‌دهد. احتمالاً ملاتونین با ارتباط با مجموعه‌ای از گیرنده‌های هسته‌ای مانند RZR/ROR، موجب القای بیان p53 می‌شود. ملاتونین به همراه رتینوئیک اسید تمام ترانس، موجب تنظیم کاهشی بیان Bcl-2 و تنظیم افزایشی بیان Bax و TGF β 1 می‌شود (۳۶). با توجه به مطالعات صورت گرفته، احتمال داده می‌شود که ملاتونین با کاهش تمایز سلولی، نگه‌داشتن سلول‌ها در فاز G₁/G₀ چرخه سلولی، افزایش طول چرخه سلولی، تنظیم افزایشی P53 و p21، کاهش حالت تهاجم سلول‌های سرطانی، افزایش gap junction ها، E-cadherin،

قرار داده و رشد تومور را کاهش دهند (۱۴). پروتئین P53 یکی از فاکتورهای مهم در مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلول است. تنظیم افزایشی Bax و انتقال آن از سیتوپلاسم به میتوکندری موجب فعال‌شدن P53 می‌شود (۳۰). مطالعات گذشته نشان داده است که بیان HIF- α در مسیر تبدیل‌شدن بافت طبیعی پستان به کارسینوما پستانی، به‌تدریج افزایش می‌یابد. بیان HIF- α با افزایش تکثیر سلول‌های پستان و بیان گیرنده‌های استروژن و VEGF مرتبط است (۳۱). VEGF محرک قوی در رگ‌زایی است و توسعه عواملی که این مسیر را هدف قرار می‌دهند، موجب اعتبار اصول درمانی ضد رگ‌زایی برای درمان سرطان شده‌اند. گیرنده VEGFR2 (KDR/FLK1)، نقش اصلی را در پاسخ‌دهی به هورمون VEGF دارد و به‌صورت مستقیم رگ‌زایی را در تومور کنترل می‌کند؛ به‌طوری‌که سیستم VEGF/VEGFR2 به‌عنوان یک سیستم اتوکرینی- پاراکرینی در تکثیر و حفظ سلول‌های سرطانی نقش دارند. افزون بر این، سیگنالینگ VEGFR2 در نفوذپذیری عروق، تکثیر، بقا و مهاجرت سلول‌های اندوتلیالی نقش ایفا می‌کند (۳۲). همه این مسیرها می‌توانند جایگاهی برای اثرگذاری ترکیبات اصلی عصاره هیدروالکلی *V. odorata* و یا فیتوملاتونین باشند که تأیید آن نیازمند تحقیق و بررسی بیشتری است. تومورهای جامد با ایجاد یک پاسخ رگ‌زایی در عروق اصلی میزبان، موجب تشکیل یک شبکه عروقی جدید به‌منظور تأمین مواد غذایی و اکسیژن مورد نیاز می‌شوند. این پاسخ رگ‌زایی، دلیل اصلی برای رشد تومور و گسترش متاستاز در بدن است. تعدادی از فاکتورهای استرس‌زای سلولی مانند: هیپوکسی، محدودیت غذایی و ROS محرک‌های مهم رگ‌زایی هستند. بیان افزایشی پروتئین Ras به‌وسیله HIF- α موجب تنظیم افزایشی VEGF-A (محرک اصلی

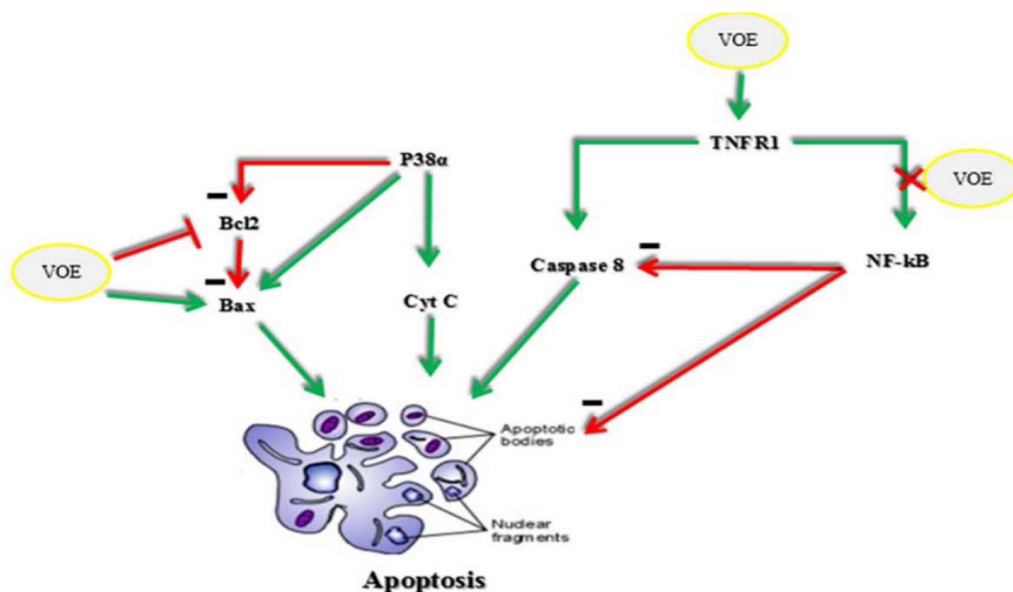
اتصال‌های بین سلولی و درنهایت، کاهش تکثیر سلولی، از رشد تومورهای 4T1 جلوگیری می‌نماید (۳۷). مشخص شده است که گیرنده MT1 ملاتونین با مهار آنزیم آدنیل سیکلاز و به دنبال آن کاهش تولید cAMP، فعالیت پروتئین کینازهای گوناگونی مانند PKC، PKA، MAPK و بیان ژن‌های مختلف که در تکثیر سلولی، آنژیوژنز، تمایز سلولی و متاستاز نقش دارند، کنترل می‌کند (۱۹). برخی از محققان نشان داده‌اند که غلظت‌های فارماکولوژیک ملاتونین ممکن است به صورت مستقیم یا غیرمستقیم، رگ‌زایی را با کاهش تکثیر سلول‌های اندوتلیالی و فعال کردن فاکتورهای ضد رگ‌زایی در تومورها مهار کند. تیمار مدل‌های زئوگرافت سرطان سینه ER- (MDA-MB-231) با ملاتونین نشان داده که ملاتونین می‌تواند در این مدل‌های حیوانی، آنژیوژنز را با کاهش بیان VEGFR2 و کاهش تراکم عروقی (Micro-Vessel Density: MVD) مهار کند (۱۹). مطالعات قبلی نیز توضیح می‌دهند که تولید VEGF در سرطان‌های کبد انسانی

و (Human Pancreatic Carcinoma Cells: PANC-1) و Adenocarcinoma Cells (Human Alveolar : A549) توسط ملاتونین کاهش پیدا می‌کند (۳۸، ۱۹). هیپوکسی (HIF-alpha) در تومور نیز، با افزایش بیان VEGFR2، مسیرهای سیگنالینگ بقا و رگ‌زایی را فعال می‌کند. در شرایط *in vitro*، ملاتونین با مهار بیان HIF-alpha از آنژیوژنز توموری در رده‌های سلولی سرطان‌های پروستات و کولون جلوگیری می‌کند (۳۹). این در حالی است نشان داده شده، دوز ۴۰ mg/kg ملاتونین در مدل‌های زئوگرافت سرطان سینه، با وجود کاهش VEGF نتوانسته تغییر معناداری در بیان HIF-alpha ایجاد کند (۱۹)؛ بنابراین، می‌توان پیشنهاد کرد که ملاتونین به واسطه کاهش فاکتورهای اصلی در مسیر رگ‌زایی مانند VEGF و درنهایت آنژیوژنز، رشد تومورهای 4T1 را کاهش داده است (تصویر شماره ۷).

به‌طور خلاصه، احتمالاً VOE با مهار فعالیت NF-kB، اثر مهاری آن را بر روی Caspase8 و درنهایت، آپوپتوز خنثی کرده و از طرف مقابل، با



تصویر شماره ۷: اثر احتمالی ملاتونین (MEL) بر آنژیوژنز



تصویر شماره ۸: مکانیسم احتمالی گل بنفشه (VOE) بر آپوپتوز

ضد رگ‌زایی نتایج مثبتی به‌دنبال داشته است؛ اما هنوز میزان بقا به‌صورت طولانی‌مدت را تضمین نمی‌کنند. به‌روشنی مشخص شده است که استفاده از درمان‌های ترکیبی، می‌تواند میزان بقا را به اندازه قابل توجهی افزایش دهد؛ به‌عنوان مثال، استفاده از مکمل‌های گیاهی می‌تواند یک روش کمکی در کنار درمان‌های دارویی، موجب افزایش تأثیرات مثبت درمانی این داروها شود. عصاره هیدروالکلی گل بنفشه موجب کاهش تکثیر سلولی در مدل‌های 4T1 سرطان سینه شد؛ شاید استفاده از دوزهای بالاتری از عصاره، بتواند تأثیرات مثبت‌تری را نشان دهد.

سپاسگزاری

این مقاله بخشی از رساله دکترای فیزیولوژی جانوری مصوب دانشگاه شهید بهشتی تهران می‌باشد که در قالب طرح تحقیقاتی و با حمایت مرکز تحقیقات سرطان دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران انجام شد.

افزایش بیان TNFR1 و به‌واسطه Caspase8 میزان آپوپتوز را افزایش داده است. همچنین، VOE احتمالاً با افزایش نسبت Bax/Bcl-2 مسیر میتوکندریایی آپوپتوز را فعال کرده است (تصویر شماره ۸).

تکثیر سلولی و آنژیوژنز، بخش‌های مهمی از فرآیندهای دخیل در بقا و رشد تومورها هستند. رشد عروق جدید برای افزایش تکثیر سلولی و متاستاز سلول‌های سرطانی ضروری است. مهار رگ‌زایی و تقسیم سلولی نیز از تاکتیک‌های اصلی در محدود کردن سرطان به‌شمار می‌روند (۲۶). کشف مهارکننده‌های رگ‌زایی، امید به کاهش مرگ و میر در بیماران سرطانی را افزایش می‌دهد. مهار پروتئازها (مانند مهار MMP)، مهاجرت، تکثیر سلول‌های اندوتلیالی، فاکتورهای رگ‌زایی و پروتئین‌های ماتریکس سطح سلولی مانند اینتگرین، مهم‌ترین اهداف بالینی برای مهار آنژیوژنز هستند (۴۰). در این مسیرها، استفاده از داروهای

References

1. Wiechmann L , Kuerer HM. The molecular journey from ductal carcinoma in situ to

- invasive breast cancer. *Cancer*. 2008; 112(10): 2130-2142.
2. Urruticoechea A, Alemany R, Balart J, Villanueva A, Vinals F, Capella G. Recent advances in cancer therapy :an overview. *Current pharmaceutical Design*. 2010; 16(1): 3-10.
 3. Pandi-Perumal SR, Srinivasan V, Maestroni G, Cardinali D, Poeggeler B, Hardeland R. Melatonin. *Febs J*. 2006; 273(13): 2813-2838.
 4. Hill SM, Belancio VP, Dauchy RT, Xiang S, Brimer S ,Mao L, et al. Melatonin: an inhibitor of breast cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2015; 22(3): R183-R204.
 5. Cos S, González A, Martínez-Campa C, Mediavilla MD, Alonso-González C, Sánchez-Barceló EJ. Estrogen-signaling pathway: a link between breast cancer and melatonin oncostatic actions. *Cancer Detect Prev*. 2006; 30(2): 118-128.
 6. Cos S , Blask DE. Melatonin modulates growth factor activity in MCF-7 human breast cancer cells. *J pineal Res*. 1994; 17(1): 25-32.
 7. Vriend J , Reiter RJ. Breast cancer cells: Modulation by melatonin and the ubiquitin-proteasome system—a review. *Mol Cell Eendocrinol*. 2015; 417: 1-9.
 8. Besharati-Seidani A, Jabbari A, Yamini Y, Saharkhiz M. Rapid extraction and analysis of volatile organic compounds of Iranian feverfew (*Tanacetum parthenium*) using headspace solvent microextraction (HSME), and gas chromatography/mass spectrometry. *Flav Frag J*. 2006; 21(3): 502-509.
 9. Ansari M, Rafiee K, Yasa N, Vardasbi S, Naimi S, Nowrouzi A. Measurement of melatonin in alcoholic and hot water extracts of *Tanacetum parthenium*, *Tripleurospermum disciforme* and *Viola odorata*. *DARU* . 2010; 18(3): 173-178.(persian).
 10. Elhassaneen Y, Sabry S, Musalum T ,El-Eskafy A, El-Fatah AA. Effect of sweet violet (*Viola odorata* L.) blossoms powder on liver and kidney functions as well as serum lipid peroxidation of rats treated with carbon tetrachloride. *J Am Sci*. 2013; 9(5): 88-95.
 11. Barekat T, Otroshy M, Samsam-Zadeh B, Sadrarhami A, Mokhtari A. A novel approach for breaking seed dormancy and germination in *Viola odorata* (A medicinal plant). *J Nov Appl Sci*. 2013; 2(10): 513-516.
 12. Saether O, Craik DJ, Campbell ID, Sletten K, Juul J, Norman DG. Elucidation of the primary and three-dimensional structure of the uterotonic polypeptide kalata B1. *Biochemistry*. 1995; 34(13): 4147-4158.
 13. Gerlach SL, Rathinakumar R, Chakravarty G, Göransson U, Wimley WC, Darwin SP, et al. Anticancer and chemosensitizing abilities of cycloviolacin O2 from *Viola odorata* and psyle cyclotides from *Psychotria leptothyrsa*. *Biopolymers*. 2010; 94(5): 617-625.
 14. Batra P , Sharma AK. Anti-cancer potential of flavonoids: recent trends and future perspectives. *3 Biotech*. 2013; 3(6): 439-454.
 15. Stojković D, Glamočlija J, Ćirić A, Šiljegović J, Nikolić M, Soković M. Free radical scavenging activity of *Viola odorata* water extracts. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*. 2011; 17(3): 285-290.
 16. Alipanah H, Bigdeli MR ,Esmaeili MA, Akbari ME. Effect of *Viola odorata* Extract on Cell Survival of Triple Negative Breast Cancer MDA-MB-468 Cells. *J Mazandaran Univ Med Sci*. 2016; 25(132): 186-

- 199.(persian).
17. Sprowl JA, Reed K, Armstrong SR, Lanner C, Guo B, Kalatskaya I, et al. Alterations in tumor necrosis factor signaling pathways are associated with cytotoxicity and resistance to taxanes: a study in isogenic resistant tumor cells. *Breast Cancer Res.* 2012; 14(1): R2
 18. Chen Q, Massagué J. Molecular pathways: VCAM-1 as a potential therapeutic target in metastasis. *Clin Cancer Res.* 2012; 18(20): 5520-5525.
 19. Jardim-Perassi BV, Arbab AS, Ferreira LC, Borin TF, Varma NR, Iskander A, et al. Effect of melatonin on tumor growth and angiogenesis in xenograft model of breast cancer. *PLoS one.* 2014; 9(1): e85311.
 20. Sakarkar D, Deshmukh V. Ethnopharmacological review of traditional medicinal plants for anticancer activity. *Int J Pharm Tech Res.* 2011; 3(1): 298-308.
 21. Rivas MA, Carnevale RP, Proietti CJ, Roseblit C, Beguelin W, Salatino M. TNF α acting on TNFR1 promotes breast cancer growth via p42/P44 MAPK, JNK, Akt and NF- κ B-dependent pathways. *Exp Cell Res.* 2008; 314(3): 509-529.
 22. Smolnikar K, Löffek S, Schulz T, Michna H, Diel P. Treatment with the pure antiestrogen faslodex (ICI 182780) induces tumor necrosis factor receptor 1 (TNFR1) expression in MCF-7 breast cancer cells. *Breast Cancer Research Treat.* 2000; 63(3): 249-259.
 23. Micheau O, Tschopp J. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell.* 2003; 114(2): 181-190.
 24. Salvesen GS, Duckett CS. IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002; 3(6): 401-410.
 25. Catz SD, Johnson JL. Transcriptional regulation of bcl-2 by nuclear factor kappa B and its significance in prostate cancer. *Oncogene.* 2001; 20(50): 7342-7351.
 26. Weis SM, Cheresh DA. Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets. *Nat Med.* 2011; 17(11): 1359-1370.
 27. Czabotar PE, Lessene G, Strasser A, Adams JM. Control of apoptosis by the BCL-2-protein family: implications for physiology and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014; 15(1): 49-63.
 28. Sadeghnia HR, Ghorbani Hesari T, Mortazavian SM, Mousavi SH, Tayarani-Najaran Z, Ghorbani A. Viola tricolor induces apoptosis in cancer cells and exhibits antiangiogenic activity on chicken chorioallantoic membrane. *Biomed Res Int.* 2014; 2014: 8.
 29. Sadeghnia HR, Ghorbani Hesari T, Mortazavian SM, Mousavi SH, Tayarani-Najaran Z, Ghorbani A. Viola tricolor induces apoptosis in cancer cells and exhibits antiangiogenic activity on chicken chorioallantoic membrane. *BioMed Res Int.* 2014; 2014: 8.
 30. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, et al. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell.* 1997; 91(4): 479-489.
 31. Bos R, Zhong H, Hanrahan CF, Mommers EC, Semenza GL, Pinedo HM, et al. Levels of hypoxia-inducible factor-1 α during breast carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst.* 2001;

- 93(4): 309-314.
32. Guo S, Colbert LS, Fuller M, Zhang Y, Gonzalez-Perez RR. Vascular endothelial growth factor receptor-2 in breast cancer. *Biochim Biophys Acta (BBA)*. 2010; 1806(1): 108-121.
33. Chandel N, Maltepe E, Goldwasser E, Mathieu C, Simon M, Schumacker P. Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998; 95(20): 11715-11720.
34. Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radic Biol Med*. 2010; 49(11): 1603-1616.
35. Liu H, Xu L, Wei JE, Xie MR, Wang SE, Zhou RX. Role of CD4+ CD25+ Regulatory T Cells in Melatonin-Mediated Inhibition of Murine Gastric Cancer Cell Growth In Vivo and In Vitro. *Anat Rec*. 2011; 294(5): 781-788.
36. Mediavilla M, Cos S, Sanchez-Barcelo E. Melatonin increases p53 and p21WAF1 expression in MCF-7 human breast cancer cells in vitro. *Life Sci*. 1999; 65(4): 415-420.
37. Cos S, González A, Martínez-Campa C, Mediavilla MD, Alonso-González C, Sánchez-Barceló EJ. Estrogen-signaling pathway: a link between breast cancer and melatonin oncostatic actions. *Cancer Detect prev*. 2006; 30(2): 118-128.
38. Dai M, Cui P, Yu M, Han J, Li H, Xiu R. Melatonin modulates the expression of VEGF and HIF-1 α induced by CoCl₂ in cultured cancer cells. *J Pineal Res*. 2008; 44(2): 121-126.
39. Park JW, Hwang MS, Suh SI, Baek WK. Melatonin down-regulates HIF-1 α expression through inhibition of protein translation in prostate cancer cells. *J Pineal Res*. 2009; 46(4): 415-421.
40. Nishida N, Yano H, Nishida T, Kamura T, Kojiro M. Angiogenesis in cancer. *Vasc Health Risk Manage*. 2006; 2(3): 213-219.